

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 3 日 (03.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/054191 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/435, 19/00, G01N 33/68 県 伊那市 大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所内 Nagano (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13363 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 20 日 (20.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2001-387510 2001 年 12 月 20 日 (20.12.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県 名古屋市中区 丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビル 5 F Aichi (JP).
- (72) 発明者: および (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 唐澤 智司 (KARASAWA, Satoshi) [JP/JP]; 〒396-0002 長野
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLUORESCENT PROTEINS

(54) 発明の名称: 蛍光蛋白質

(57) Abstract: It is intended to provide novel fluorescent proteins originating in an organism other than *Aequorea coerulescens*. Namely, a fluorescent protein originating in *Fungia* sp. which has the following characteristics: (1) showing a maximum excitation wavelength of 455 nm and a maximum fluorescent wavelength of 488 nm; (2) showing a molar absorptivity at 455 nm of from 38700 or 27700; (3) showing a quantum yield of 0.85 or 0.81; and (4) showing a stable pH sensitivity of the fluorescent characteristics at pH 5 to 9. Another fluorescent protein originating in *Fungia* sp. which has the following characteristics: (1) showing a maximum excitation wavelength of 548 nm and a maximum fluorescent wavelength of 561 nm; (2) showing a molar absorptivity at 548 nm of from 75900 or 51000; (3) showing a quantum yield of 0.44 or 0.50; (4) showing a pH sensitivity of the fluorescent characteristics of pKa<5.0.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/054191 A1

WO 03/054191 A1



(57) 要約:

本発明の目的は、オワンクラゲ以外の生物に由来する新規な蛍光蛋白質を提供することである。本発明によれば、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

- (1) 励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である；
- (2) 455 nm におけるモル吸光係数が、38700 又は 27700 である；
- (3) 量子収率が 0.85 又は 0.81 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が pH 5～9 で安定である；

並びに、

クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である；
- (2) 548 nm におけるモル吸光係数が、75900 又は 51000 である；
- (3) 量子収率が 0.44 又は 0.50 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が $pK_a < 5.0$ である。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

明細書

蛍光蛋白質

技術分野

本発明は、改善された特性を有する新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

背景技術

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の ϵ および Φ は、それぞれ 60,000~100,000 M⁻¹cm⁻¹ および 0.6~0.8 であり (Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

また、GFP 変異体の他の例として、シアン色蛍光蛋白質 (CFP) があり、ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

発明の開示

本発明は、オワンクラゲ又はイソギンチャク以外の生物に由来する新規な蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、オワンクラゲ又はイソギンチャク由来の蛍光蛋白質と比較して改善された蛍光特性を有する新規な蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

上記課題を解決するために、本発明者らは蛍光を発するサンゴに着目し、既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列に基づいて設計した好適なプライマーを用いてサンゴから蛍光蛋白質遺伝子を取得すべく鋭意研究を重ねた結果、先に蛍光蛋白質遺伝子を取得したアザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*) とは別種のサンゴであるクサビライシ (*Fungia* sp.) の cDNA ライブラリーから上記プライマーを用いて蛍光蛋白質遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたクサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、当該蛍光蛋白質が所望の蛍光特性を有することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

- (1) 励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である；
- (2) 455 nm におけるモル吸光係数が、38700 又は 27700 である；
- (3) 量子収率が 0.85 又は 0.81 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が pH 5～9 で安定である；

本発明によれば、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質もまた提供される。

- (1) 励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である；
- (2) 548 nm におけるモル吸光係数が、75900 又は 51000 である；
- (3) 量子収率が 0.44 又は 0.50 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が $pK_a < 5.0$ である；

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

本発明の別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質が提供される。

（a）配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

（b）配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

さらに、本発明の別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質もまた提供される。

（a）配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

（b）配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 6 4 番目のシステインがアラニンに置換されているアミノ酸配列、又は配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 2 1 1 番目のグルタミン酸がアラニンに置換されているアミノ酸配列を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示す蛋白質をコードする DNA もまた提供される。

（a）配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

（b）配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、（a）又は（b）に示す蛋白質をコードする DNA もまた提供される。

（a）配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

(b) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA もまた提供される。

(a) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の DNA を有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の DNA 又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質であり、さらに好ましくは他の蛋白質は細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質 (KCy-1、KCy-2) と ECFP、本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質 (KO-1、KO-2) と DsRed の蛍光スペクトル及び励起スペクトルを比較した結果を示す。

図2は、本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質である KCy-1 と KCy-2、KO-1 と KO-2 の蛍光特性を解析した結果を示す。

(1) Kcy-1 と Kcy-2 の大腸菌での発色の違い

(400nm で励起したときの 488nm の蛍光)

(2) KO-1 と KO-2 の大腸菌での発色の違いを示す。

(500nm で励起したときの 561nm の蛍光)

(3) KO-1 と KO-2 における蛍光変化

(470nm で励起したときのオレンジ成分 (561nm) / グリーン成分 (508nm) の値 (成熟度))

図3は本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質 (KO-1 及び KO-2) の グリーン成分 (508nm)、オレンジ成分 (561nm) の時間経過による変化を示す。

図4は本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質 (KCy-1、KCy-2、KO-1 及び KO-2) の蛍光強度の pH 感受性を示す。

図5は、本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質の変異体 (KO-C64A) の蛍光 (em) 及び励起 (ex) スペクトル (左図)、並びに吸収スペクトル (右図) を示す。

図6は、本発明のクサビライシ由来の蛍光蛋白質の変異体 (KO-E211A) の蛍光 (em) 及び励起 (ex) スペクトル (左図)、並びに吸収スペクトル (右

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

図)を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛍光蛋白質

本発明の蛍光蛋白質は、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来のもので、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である；
- (2) 455 nm におけるモル吸光係数が、38700 又は 27700 である；
- (3) 量子収率が 0.85 又は 0.81 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が pH 5～9 で安定である；

本発明のもう一つの蛍光蛋白質は、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来のもので、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である；
- (2) 548 nm におけるモル吸光係数が、75900 又は 51000 である；
- (3) 量子収率が 0.44 又は 0.50 である；及び
- (4) 蛍光特性の pH 感受性が $pK_a < 5.0$ である

クサビライシ (*Fungia* sp.) はサンゴの 1 種で、主に西部大西洋に生息し、群体の外形は多角形で触手が長く、全体が鮮やかなオレンジ色を呈することを特徴とする。

なお、本書中以下の実施例では、クサビライシ (*Fungia* sp.) を出発材料として上記特性を有する本発明の蛍光蛋白質を単離したが、クサビライシ (*Fungia* sp.) 以外の蛍光を発するサンゴから本発明の蛍光蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような蛍光蛋白質も本発明の範囲内である。

本発明の第 1 の蛍光蛋白質 (KC y-1) は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である。モル吸光係数は 38700 (455 nm) あり、量子収率は 0.85 である。本発明の第 2 の蛍光蛋白質

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

白質 (KCy-2) は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である。モル吸光係数は 27700 (455 nm) であり、量子収率は 0.81 である。これに対して ECFP (クロンテック) のモル吸光係数は 28750 (435 nm) であり、量子収率は 0.40 である。

本発明の第 3 の蛍光蛋白質 (KO-1) は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である。モル吸光係数は 75900 (548 nm) であり、量子収率は 0.44 である。本発明の第 4 の蛍光蛋白質 (KO-2) は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である。モル吸光係数は 51000 (548 nm) であり、量子収率は 0.50 である。これに対して DsRed (クロンテック) のモル吸光係数は 86100 (559 nm) であり、量子収率は 0.29 である。

モル吸光係数は蛍光分子 1 モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発する事が出来るかを表した数値であるため、モル吸光係数、量子収率の値が大きいことは蛍光が強いことを示す。従って、上記の本発明蛍光蛋白質のうちシアン系蛍光蛋白質である KCy-1 及び KCy-2 は、ECFP よりもモル吸光係数、量子収率の値が大きいので、ECFP よりもより強い蛍光を発する。具体的には、KCy-1 は ECFP よりも約 2~3 倍明るく、KCy-2 は ECFP よりも約 1.5 倍明るい。

また、励起および蛍光の極大波長に関しては ECFP と本発明の蛍光蛋白質 KCy-1 及び KCy-2 との間に大きな差はないが、本発明の蛍光蛋白質 KCy-1 及び KCy-2 の励起、蛍光スペクトルは ECFP のように長波長側に肩がなくシャープであるため、他の蛍光分子との組み合わせて行うマルチカラーイメージング等に際して有利と言える。

また、KCy-1 及び KCy-2 は、pH 5~9 の範囲において蛍光特性の pH 感受性が低いことを特徴とする。即ち、pH 5~9 の範囲において蛍光強度のピーク値の変動が少なく、この pH 範囲において高い蛍光強度を維持することができる。従来から使用されている ECFP の場合には、pH 7 以下では蛍光強度

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

が低下するため生体内での使用に際して制約があったが、本発明の蛍光蛋白質にはそのような制約がない。

一方、上記の本発明蛍光蛋白質のうちオレンジ蛍光蛋白質であるKO-1、KO-2は、イソギンチャク (Discosoma) 由来赤色蛍光蛋白質 (DsRed) より約2倍明るい。また、KO-1、KO-2は、既存の蛍光タンパク質とは異なる波長に蛍光スペクトルのピークを有している。即ち、EYFP (黄色) (クロンテック社) は530 nm付近に蛍光スペクトルのピークを持ち、DsRed (クロンテック社) は580 nm付近に蛍光スペクトルのピークを持つのに対し、本発明のKO-1及びKO-2は、561 nm付近に蛍光スペクトルのピークを持つ。

さらに本発明の蛋白質KO-1の変異体の具体例としては、

- (1) KO-1のアミノ酸配列中において64番目のシステインをアラニンに置換することにより得られる、蛍光特性がKOに較べて短波長側にシフトした緑色 (蛍光極大 508 nm、励起極大 496 nm) の蛍光を放つ変異体、並びに、
 - (2) KO-1のアミノ酸配列中において211番目のグルタミン酸をアラニンに置換することにより得られる、KOに較べて蛍光特性が長波長側にシフトした赤色 (蛍光極大 578 nm、励起極大 563 nm) の蛍光を放つ変異体、
- を挙げることができる。

本発明の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1又は2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

本発明の蛍光蛋白質のさらなる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号3又は4に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質
- (b) 配列番号3又は4に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本明細書で言う「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

本明細書で言う「同等の蛍光特性」とは、同等の蛍光強度、同等の励起波長、同等の蛍光波長、同等の pH 感受性などを有することを意味する。

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードする DNA を入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号 1 から 4 の何れかに記載したアミノ酸配列並びに配列番号 5 から 8 の何れかに記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光蛋白質の cDNA クローンを鋳型にして PCR を行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA を取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の一部の断片を上記した PCR により得た場合には、作製した DNA 断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質をコードする DNA を得ることができる。この DNA を適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

(2) 本発明の DNA

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA が挙げられる。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

(a) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA が挙げられる。

(a) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す DNA もまた挙げられる。

(a) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す DNA もまた挙げられる。

(a) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

本発明の DNA は、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができ、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって製造することもできる。本発明の DNA 又はその断片の作製方法については、本明細

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

書中上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモータ等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子 (Bacillus licheniformis α -amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子 (Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子 (Bacillus Subtilis alkaline protease gene) もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性蛋白プロモータ、バキュロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4c プロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは *tpiA* プロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ポンベTP1遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイペリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスボラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual ; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である Hi Five (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

(5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1から4の何れかに記載したアミノ酸配列及び配列番号5から8の何れかに記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲッティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモータ活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモータの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモータの活性を測定することが可能である。被検プロモータとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

上記被検アミノ酸配列のターゲッティング活性の検出やプロモータ活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」（P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327）、「pCAGGS」（H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200 (1991)）、「pRc/CMV」（インビトロゲン社製）、「pCDM8」（インビトロゲン社製）などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」, 「pRS304」, 「pRS305」, 「pRS306」, 「pRS313」, 「pRS314」, 「pRS315」, 「pRS316」（R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetic s 122: 19-27）、「pRS423」, 「pRS424」, 「pRS425」, 「pRS426」（T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

-122) などが好適に用いられる。

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO (Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK (normal rat kidney)細胞、「*Saccharomyces cerevisiae*」などの酵母細胞や大腸菌 (*E. coli*) 細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質 (蛋白質Xとする) とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡 (カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット 09) や画像解析装置 (ATTO デジタルイメージアナライザー) などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネ

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

ーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の蛍光蛋白質のうち励起極大波長が455nmであり、蛍光極大波長は488nmである蛍光蛋白質の場合は、励起光440～460nm、蛍光480～520nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、本発明の蛍光蛋白質のうち励起極大波長が548nmであり、蛍光極大波長は561nmである蛍光蛋白質の場合は、励起光530～550nm、蛍光550～600nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却CCDカメラを使用する。冷却CCDカメラは、CCDを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

(6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

(実施例1) 珊瑚(クサビライシ)からの新規蛍光蛋白遺伝子の単離

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

(1) total RNA の抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料には口盤部分が赤色とオレンジ色を呈する2個体のクサビライシ (*Fungia* sp.) を用いた。クサビライシをハンマーで碎き、湿重量4 gに"TRIzol" (GIBCO BRL) を7.5 ml 加えて攪拌し、 $1500 \times g$ で10分間遠心した。上清にクロロホルム1.5 ml を加え、15秒間攪拌した後、3分間静置した。 $7500 \times g$ で15分間遠心した。上清にイソプロパノール3.75 ml を加え、15秒間攪拌した後10分間静置した。 $17000 \times g$ で10分間遠心した。上清を捨て70%エタノールを6 ml 加えて $17000 \times g$ で10分間遠心した。上清を捨て沈殿をDEPC水200 μ l で溶解した。DEPC水で溶解した total RNA を100倍に希釈してO.D.260 と O.D.280 の値を測定してRNA濃度を測った。赤色個体から51.6 μ g、オレンジ色の個体から70 μ g の total RNA を得た。

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 3 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット"Ready To Go"(Amersham Pharmacia)によりcDNA(33 μ l)を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA(33 μ l) のうち3 μ l を鋳型としてPCRを行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直して作製した。使用したプライマーの配列を以下に記載する。

5'-GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer1) (配列番号9)

5'-ACVGGDCCATYDGVAAAGAAATT-3' (primer2) (配列番号10)

(ここで、R=A 又は G を示し、Y=C 又は T を示し、V=A、C 又は G を示し、D=A、G 又は T を示す。)

以下のPCR反応液組成を使用した。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリ Q	3 5 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

以下の PCR 反応条件を使用した。

9 4℃で1分 (PAD)

9 4℃で3秒 (変性)

5 2℃で30秒 (テンプレートへのアニーリング)

7 2℃で1分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度1サイクルごとに0.3℃下げた。即ち、30サイクル時の温度は43℃となる。

7 2℃で7分 (最後の伸長)

4℃ (保持)

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1 μ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で、予想された大きさの 350bp のバンドを切り出し、精製した。

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE 法およ

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

び 3'-RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

(5) 5'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5'側の塩基配列を決定するために 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5'-RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 3 μ g を使用した。

オレンジ色個体の DC-tailed cDNA の一回目の増幅には、

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (配列番号 1 1)

5'-GGCTTATATGCGCACTGACTGC-3' (配列番号 1 2)

のプライマーを用いた (ここで、I はイノシンを示す)。

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (配列番号 1 3)

5'-TATCTCTTCAGGATATTTAGT-3' (配列番号 1 4)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 700bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

同じく赤色個体の DC-tailed cDNA の一回目の増幅には、

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (配列番号 1 5)

5'-GGGAAAAGTGCCTTCAATGG-3' (配列番号 1 6)

のプライマーを用いた (ここで、I はイノシンを示す)。

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (配列番号 1 7)

5'-TCTTCGAACCTCAAACCTTTCT-3' (配列番号 1 8)

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 500bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3'側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。

作成したプライマーは以下の通りである。

オレンジ色個体用 5'- GCAGTCAGTGC GCATATAAGCC -3' (primer3) (配列番号 19)

赤色個体用 5'- CCATTGAAGGCACTTTTCCC -3' (primer4) (配列番号 20)

以下の PCR 反応組成を使用した。

PCR 反応液組成：

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer3 または primer4	1 μ l
10 μ M oligo dT primer	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

以下の PCR 反応条件を使用した。

94℃で1分(PAD)

94℃で30秒(変性)

55℃で30秒(テンプレートヘアニーリング)

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

72℃で1分（プライマー伸長）

上記3ステップを30サイクル行った。

72℃で7分（最後の伸長）

4℃（保持）

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約850bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

(7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白のN末端、C末端に相当する部分でプライマーを作製し、(2) で調製したFirst strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。プライマーはオレンジ色、赤色個体由来、共に primer5 を使用した。

5'-CGGGATCCATGAAGATGAAGTACTTTATGGATGG -3' (primer5) (配列番号21)

以下のPCR反応液組成を使用した。

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer5	1 μ l
20 μ M oligo dT primer	1 μ l
ミリQ	35 μ l
pyrobest polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

以下のPCR反応条件を使用した。

94℃で1分 (PAD)

94℃で30秒 (変性)

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

55℃で30秒 (テンプレートへのプライマーのアニーリング)

72℃で1分 (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72℃で7分 (最後の伸長)

4℃ (保持)

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約1000bpのバンドを切り出し、精製してpRSET vector (Invitrogen) の BamHI、EcoRI 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。しかしながら、大腸菌で発現させた蛋白質はオレンジ色、赤色個体由来共に蛍光は発しなかった。

今回クローニングされた遺伝子による翻訳蛋白 (オレンジ個体由来の翻訳蛋白を Kusabira-Orange、赤色固体由来の翻訳蛋白を Kusabira-Cyan とする) は、既知の蛍光蛋白 (FP486、Azami-Green) にくらべてN末端の約10アミノ酸を欠失することが明らかとなった (表1)。よってN末端に2種類の約10個のアミノ酸から成るセグメントを補充することとした。

表1 蛍光蛋白間のN末端アミノ酸配列の比較

オレンジ色個体由来	↓
Kusabira-Orange-1(KO-1)	MSVIKPEMKMKYFMDGSVNGHEFTVEGEG...
-Orange-2(KO-2)	MALSNKFIGDDMKMKYFMDGSVNGHEFTVEGEG...
赤色個体由来	
Kusabira-Cyan-1(KCy-1)	MSVIKPEMKMKYFMDGSVNGHEFTVEGEG...
-Cyan-2(KCy-2)	MALSNKFIGDDMKMKYFMDGSVNGHEFTVEGEG...
Azami-Green	MSVIKPEMKIKLCMRGTVNGHNFVIEGEG...
FP486	MALSNKFIGDDMKMTYHMDGCVNGHYFTVKGEG...

Kusabira -Orange、Cyan とともにイタリック部分 (矢印より後ろ) の配列がクローニングされた。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

一つは全体的にアミノ酸配列の似ているFP486のN末端の11アミノ酸 (MALSNKFI GDD)、もう一つは以前にクローニングしたAzami-GreenのN末端の7アミノ酸 (MS VIKPE) を用いた。その結果どちらのアミノ酸配列を付加した場合もオレンジ色個体由来のものはオレンジ色の蛍光を発するようになったが、赤色個体由来のものはシアンの蛍光を発するようになった。オレンジ色個体由来のものにAzami-GreenのN末端の7アミノ酸を付加したものをKusabira-Orange-1(KO-1) (配列番号3)、オレンジ色個体由来のものにFP486のN末端の11アミノ酸を付加したものをKusabira-Orange-2(KO-2) (配列番号4) とし、赤色個体由来のものにAzami-GreenのN末端の7アミノ酸を付加したものをKusabira-Cyan-1(KCy-1) (配列番号1)、赤色個体由来のものにFP486のN末端の11アミノ酸を付加したものをKusabira-Cyan-2(KCy-2) (配列番号2) とした。

また、KC y - 1、KC y - 2、KO - 1、及びKO - 2の全塩基配列をそれぞれ配列番号5から8に記載する。

上記4種類の蛋白はN末端にHis-tagが付くようにコンストラクトしたので発現蛋白はNi-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

(8) 蛍光特性の解析

20 μ M 蛍光蛋白、50mM HEPES pH7.5 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。KC y - 1、KC y - 2では455nmに吸収のピークが認められ、400nmにおける吸収が0.005となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈して、400nmで励起した時の蛍光スペクトルと520nmにおける蛍光による励起スペクトルを測定した。ECFP (CLONTECH) を同様に400nmにおける吸収が0.005となるようにして蛍光スペクトルを測定し、ECFPの量子収率を0.4としてKC y - 1、KC y - 2の量子収率を求めた。KO - 1、KO - 2では548nmに吸収のピークが認められ、500nmにおける吸収が0.0025となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈して、500nmで励起した時

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

の蛍光スペクトルと 590nm における蛍光による励起スペクトルを測定した。DsRed(CLONTECH)を同様に 500nm における吸収が 0.0025 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、DsRed の量子収率を 0.29 として KO-1、KO-2 の量子収率を求めた。結果を表 2 及び図 1 に示す。

表2

Kusabira-CyanとECFP(クロンテック)の比較

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
KCy-1	455nm	488nm	38700 (455nm)	0.85	pH5~9で安定	223
KCy-2	455nm	488nm	27700 (455nm)	0.81	pH5~9で安定	227
ECFP	435nm	478nm	28750 (435nm)	0.40	pKa=5.5	239

Kusabira-OrangeとDsRed(クロンテック)の比較

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
KO-1	548nm	561nm	75900 (548nm)	0.44	pKa<5.0	217
KO-2	548nm	561nm	51000 (548nm)	0.50	pKa<5.0	221
DsRed	559nm	583nm	86100 (559nm)	0.29	なし	226

(9) N末端アミノ酸配列の違いによる発現の差

上記各蛋白を大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。0.1mM IPTG で発現誘導をかけてから 17 時間、50 時間、74 時間でサンプリングを行い、蛍光分光光度計で蛍光スペクトルの変化を解析した。結果を図 2 及び図 3 示す。蛍光出現の様子は N 末端に付加したアミノ酸によって違いが見られた。オレンジ、シアンともに Azami-Green (アザミクサピライシ (*Galaxea fascicularis*) 蛍光蛋白質) の N 末端の 7 アミノ酸を付加したもののほうが蛍光を発するのが早かった。

KO-1、KO-2 ではグリーンの蛍光がでてからオレンジへと移行するが、その成熟過程が明らかに KO-1 のほうが速かった。

(10) pH 感受性の測定

KCy-1、KC y-2 では 400nm の吸収が 0.005 となるように下記の緩衝液

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

で希釈し、K O-1、K O-2 では 500nm の吸収が 0.0025 となるように下記の緩衝液で希釈して蛍光スペクトルを測定した。測定結果を図 4 に示す。

各 pH の緩衝液は次の通り、

- pH4、5 : 酢酸バッファー
- pH6 : MES バッファー
- pH7 : MOPS バッファー
- pH8 : HEPES バッファー
- pH9、10 : グリシンバッファー
- pH11 : リン酸バッファー

(実施例 2) Kusabira-Orange(KO) のアミノ酸置換変異体の作製

Kusabira-Orange(KO) はオレンジ(蛍光極大 561 nm、励起極大 548 nm)の蛍光を放つ蛍光蛋白質であるが、K O-1 のアミノ酸配列の 64 番目のシステインをアラニンに置換することにより、蛍光特性が KO に較べて短波長側にシフトした緑色(蛍光極大 508 nm、励起極大 496 nm)の蛍光を放つ変異体を得た(図 5)。また、K O-1 の 211 番目のグルタミン酸をアラニンに置換することにより、KO に較べて蛍光特性が長波長側にシフトした赤色(蛍光極大 578 nm、励起極大 563 nm)の蛍光を放つ変異体を得た(図 6)。

産業上の利用の可能性

本発明により、クラゲ以外の生物に由来する新規な蛍光蛋白質が提供されることになった。本発明の蛍光蛋白質は、所望の蛍光特性を有し、また pH 感受性が低いことから、分子生物学的分析において有用である。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

請求の範囲

1. クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。
 - (1) 励起極大波長が 455 nm であり、蛍光極大波長は 488 nm である；
 - (2) 455 nm におけるモル吸光係数が、38700 又は 27700 である；
 - (3) 量子収率が 0.85 又は 0.81 である；及び
 - (4) 蛍光特性の pH 感受性が pH 5～9 で安定である；
2. クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。
 - (1) 励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長は 561 nm である；
 - (2) 548 nm におけるモル吸光係数が、75900 又は 51000 である；
 - (3) 量子収率が 0.44 又は 0.50 である；及び
 - (4) 蛍光特性の pH 感受性が $pK_a < 5.0$ である；
3. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。
 - (a) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質
 - (b) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質
4. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。
 - (a) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質
 - (b) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質
5. 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 64 番目のシステインがアラニンに置換されているアミノ酸配列、又は配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 211 番目のグルタミン酸がアラニンに置換されているアミノ酸配列を有する蛋白質。
6. 請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

7. 以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

8. 以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 3 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質

9. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA。

(a) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 5 又は 6 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

10. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA。

(a) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 7 又は 8 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA

11. 請求項 6 から 10 の何れか 1 項に記載の DNA を有する組み換えベクター。

12. 請求項 6 から 10 の何れか 1 項に記載の DNA 又は請求項 11 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

13. 請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

成る融合蛍光蛋白質。

14. 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項13に記載の融合蛋白質。

15. 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項13又は14に記載の融合蛋白質。

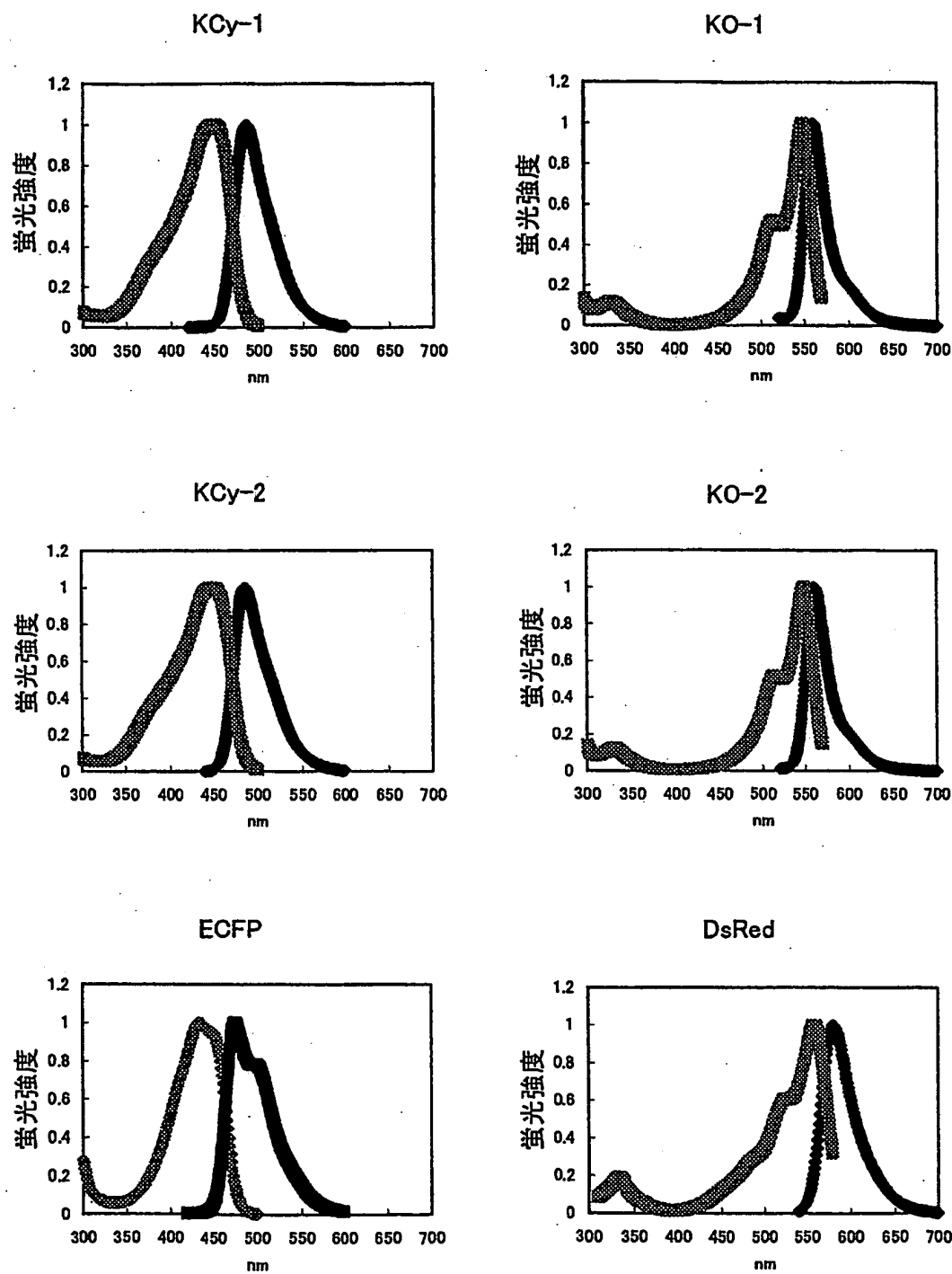
16. 請求項13から15の何れか1項に記載の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

17. 請求項1から5のいずれか1項に記載の蛍光蛋白質、請求項6から10の何れかに1項に記載のDNA、請求項11に記載の組み換えベクター、請求項12に記載の形質転換体、又は請求項13から15の何れか1項に記載の融合蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

図 1



WO 03/054191

PCT/JP02/13363

図 2

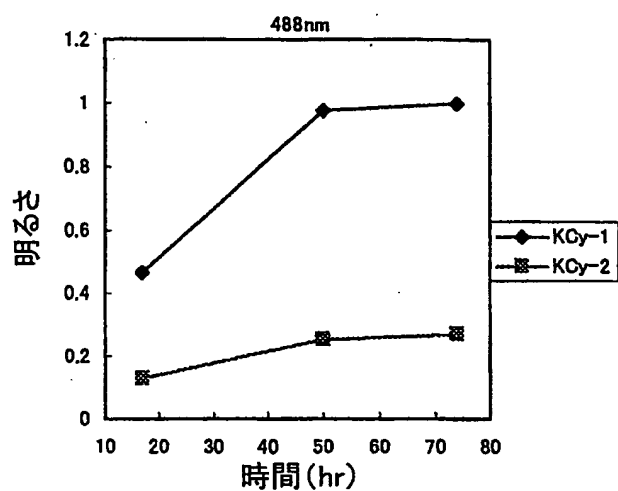


図2-1

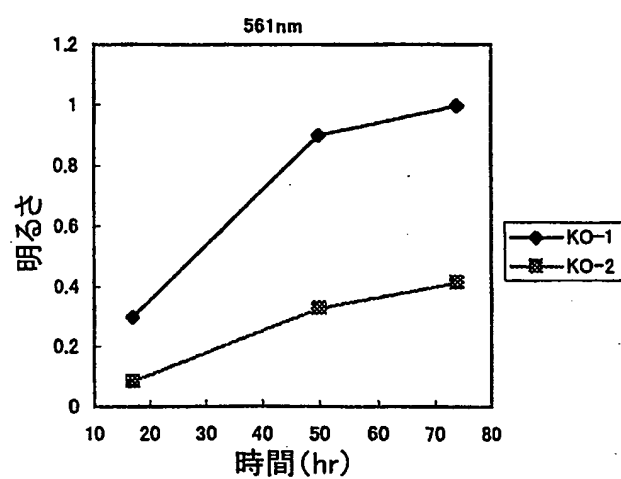


図2-2

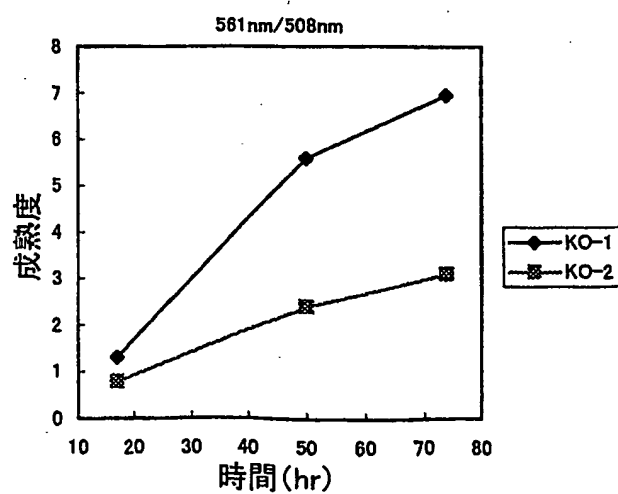


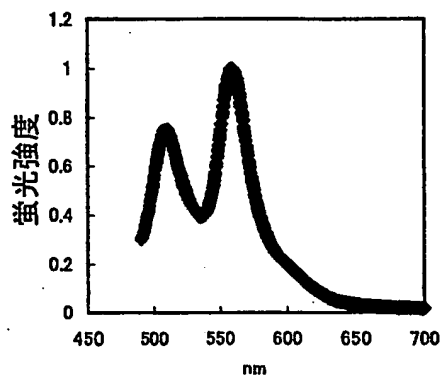
図2-3

WO 03/054191

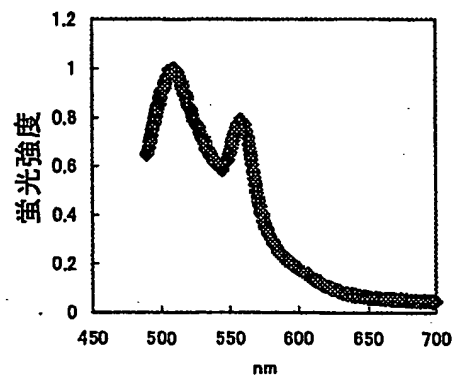
PCT/JP02/13363

図 3

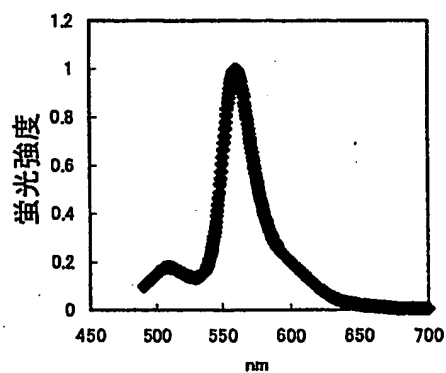
KO-1 17時間



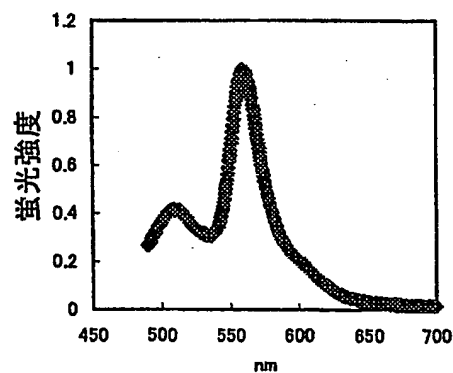
KO-2 17時間



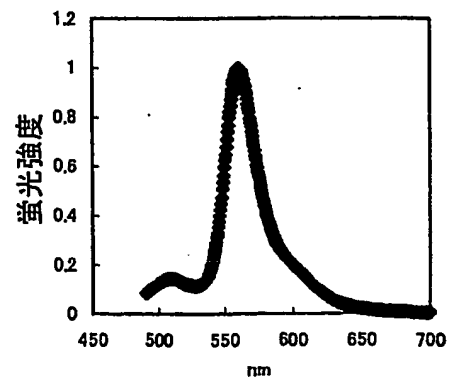
KO-1 50時間



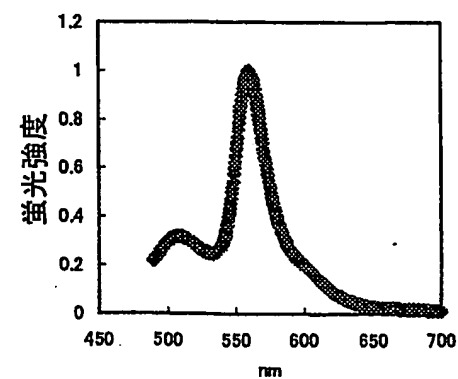
KO-2 50時間



KO-1 74時間



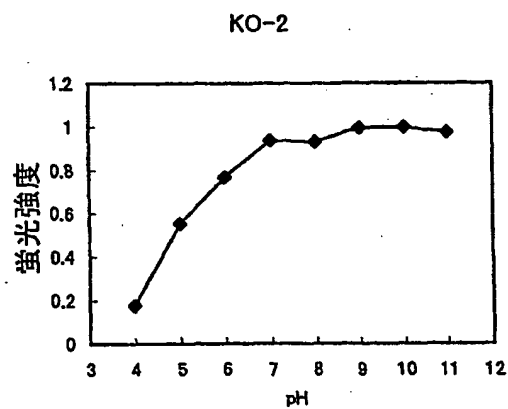
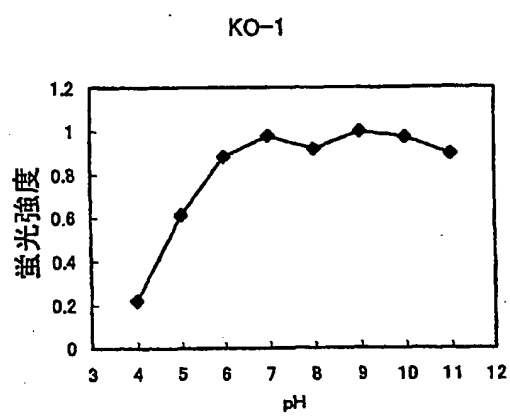
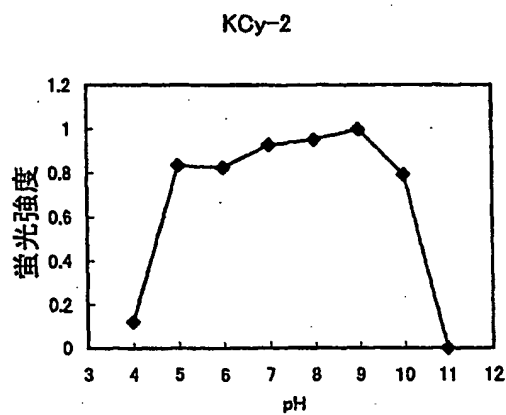
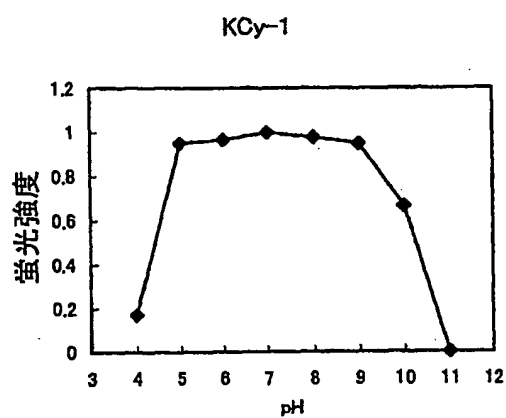
KO-2 74時間



WO 03/054191

PCT/JP02/13363

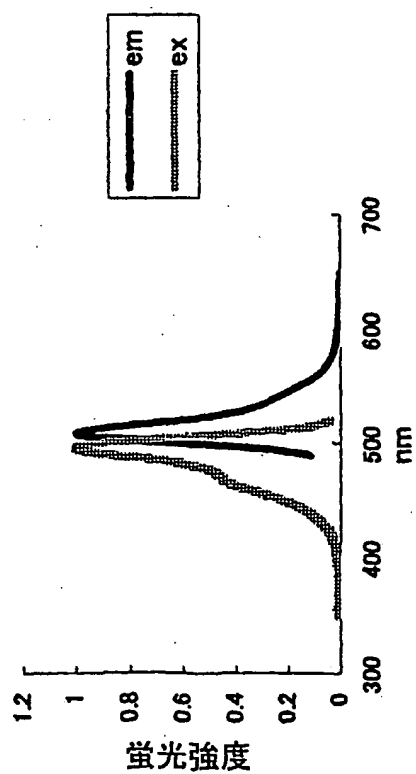
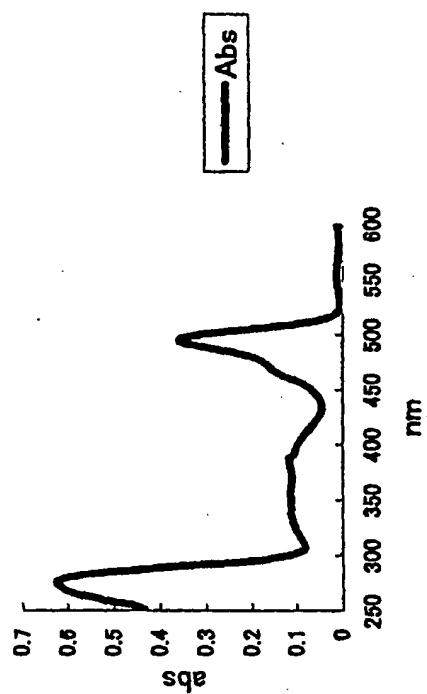
図 4



WO 03/054191

PCT/JP02/13363

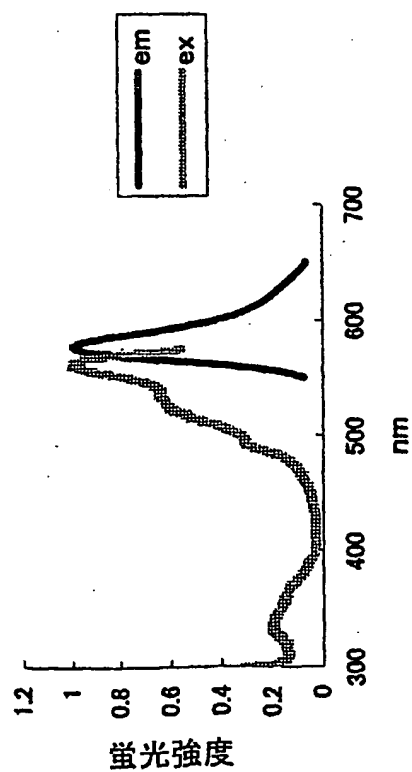
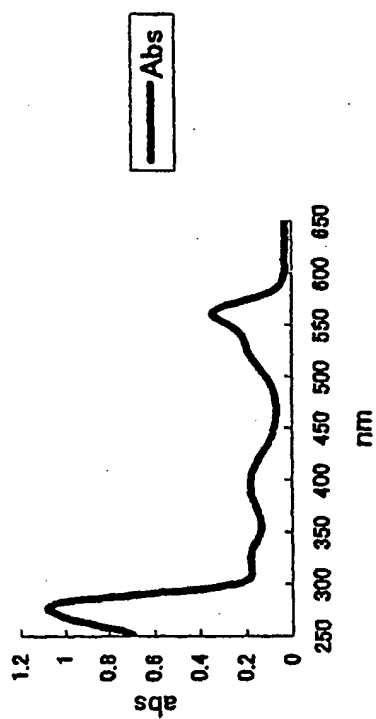
5



WO 03/054191

PCT/JP02/13363

☒ 6



WO 03/054191

PCT/JP02/13363

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent proteins

<130> A21741A

<160> 21

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 1

Met Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Lys Tyr Phe Met Asp Gly

1 5 10 15

Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu Gly Thr Gly Lys

20 25 30

Pro Tyr Glu Gly Lys His Lys Ile Thr Leu Asp Val Thr Lys Gly Gly

35 40 45

Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Leu Leu Ser Thr Val Phe Ser Tyr Gly

50 55 60

Asn Arg Cys Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65 70 75 80

Gln Cys Phe Pro Gly Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Lys Phe Glu Phe Glu

85 90 95

Asp Gly Gly Leu Ala Ile Ala Lys Ala Glu Ile Ser Leu Lys Gly Asn

100 105 110

Cys Phe Glu His Lys Ser Thr Ile Glu Gly Thr Phe Pro Asp Ser Ser

115 120 125

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Pro Ile Ala Gln Asn Lys Thr Leu Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys

130

135

140

Met Thr Val Arg Asp Gly Ser Met Lys Gly Asp Asp Ala Ala Tyr Leu

145

150

155

160

Lys Leu Val Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Tyr Phe Thr Thr Thr Tyr

165

170

175

Thr Ala Lys Lys Lys Ile Pro Asn Leu Pro Gln Ser His Phe Ile Gly

180

185

190

His Arg Ile Ser Ser Val Val Asn Gly Thr Lys Ile Gly Val Met Glu

195

200

205

Asp Ala Ile Ala His Leu Tyr Pro Phe Asn Gly Val Pro Cys Gln

210

215

220

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 2

Met Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ile Gly Asp Asp Met Lys Met Lys Tyr

1

5

10

15

Phe Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu

20

25

30

Gly Thr Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Lys His Lys Ile Thr Leu Asp Val

35

40

45

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Leu Leu Ser Thr Val

50

55

60

Phe Ser Tyr Gly Asn Arg Cys Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Pro

PCT/JP02/13363

<400> 3

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Met Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Lys Tyr Phe Met Asp Gly

1 5 10 15

Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu Gly Thr Gly Lys

20 25 30

Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala Lys

35 40 45

Gly Gly Pro Met Pro Phe Ser Phe Asp Leu Val Ser His Thr Phe Cys

50 55 60

Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr

65 70 75 80

Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu Gln

85 90 95

Phe Glu Asp Gly Gly Phe Ala Ala Val Ser Ala His Ile Ser Leu Arg

100 105 110

Gly Asn Cys Phe Glu His Lys Ser Lys Phe Val Gly Val Asn Phe Pro

115 120 125

Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn Gln Ser Ser Asp Trp Glu Pro Ser

130 135 140

Thr Glu Lys Ile Thr Thr Cys Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val Thr

145 150 155 160

Met Phe Leu Lys Leu Ala Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe Lys

165 170 175

Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gln Ser His

180 185 190

Phe Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu

195 200 205

Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Cys

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

210

215

<210> 4

<211> 221

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 4

Met Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ile Gly Asp Asp Met Lys Met Lys Tyr

1

5

10

15

Phe Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu

20

25

30

Gly Thr Gly Lys Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val

35

40

45

Thr Met Ala Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ser Phe Asp Leu Val Ser

50

55

60

His Thr Phe Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu

65

70

75

80

Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu

85

90

95

Arg Ser Leu Gln Phe Glu Asp Gly Gly Phe Ala Ala Val Ser Ala His

100

105

110

Ile Ser Leu Arg Gly Asn Cys Phe Glu His Lys Ser Lys Phe Val Gly

115

120

125

Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn Gln Ser Ser Asp

130

135

140

Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Thr Cys Asp Gly Val Leu Lys

145

150

155

160

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Lys Leu Ala Gly Gly Gly Asn His Lys

165

170

175

Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met

180

185

190

Pro Gln Ser His Phe Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly

195

200

205

Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Cys

210

215

220

<210> 5

<211> 672

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (669)

<400> 5

atg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg aag tac ttc atg gac gga 48

Met Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Lys Tyr Phe Met Asp Gly

1

5

10

15

tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca gtt gaa ggt gaa ggc aca ggc aaa 96

Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu Gly Thr Gly Lys

20

25

30

cct tac gag gga aag cac aaa ata aca ctt gac gtc acc aag ggt ggg 144

Pro Tyr Glu Gly Lys His Lys Ile Thr Leu Asp Val Thr Lys Gly Gly

35

40

45

cca ctg cct ttt gcg ttt gac ttg ttg tct aca gtg ttc tct tat ggc 192

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Leu Leu Ser Thr Val Phe Ser Tyr Gly
50 55 60
aac aga tgc ctt act aaa tat cct gac gat atc ccc gac tat ttc aaa 240
Asn Arg Cys Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Pro Asp Tyr Phe Lys
65 70 75 80
caa tgc ttt cct gga ggc tat tca tgg gaa aga aag ttt gag ttc gaa 288
Gln Cys Phe Pro Gly Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Lys Phe Glu Phe Glu
85 90 95
gat ggc ggg ttg gct ata gcc aaa gcg gaa ata agc ctt aaa gga aac 336
Asp Gly Gly Leu Ala Ile Ala Lys Ala Glu Ile Ser Leu Lys Gly Asn
100 105 110
tgc ttc gaa cac aaa tcc acc att gaa ggc act ttt ccc gat agc agt 384
Cys Phe Glu His Lys Ser Thr Ile Glu Gly Thr Phe Pro Asp Ser Ser
115 120 125
cct att gcg caa aac aag acg cta gga tgg gaa cca tcc acc gag aag 432
Pro Ile Ala Gln Asn Lys Thr Leu Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys
130 135 140
atg acc gtc cgc gac gga tca atg aag ggt gat gat gcg gcc tac ctc 480
Met Thr Val Arg Asp Gly Ser Met Lys Gly Asp Asp Ala Ala Tyr Leu
145 150 155 160
aaa ttg gtg gga ggc ggc aat cac aaa tgc tac ttt aca act acc tac 528
Lys Leu Val Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Tyr Phe Thr Thr Thr Tyr
165 170 175
aca gcg aag aaa aag att cct aac ctg cca caa agc cat ttc att ggg 576
Thr Ala Lys Lys Lys Ile Pro Asn Leu Pro Gln Ser His Phe Ile Gly
180 185 190
cat cgc atc tcc agt gtc gtc aat ggc act aaa att gga gtg atg gaa 624

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

His Arg Ile Ser Ser Val Val Asn Gly Thr Lys Ile Gly Val Met Glu

195

200

205

gat gca att gct cat ctt tac cct ttt aat ggc gtg cca tgc cag tga 672

Asp Ala Ile Ala His Leu Tyr Pro Phe Asn Gly Val Pro Cys Gln

210

215

220

<210> 6

<211> 684

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (681)

<400> 6

atg gcc ctg agc aac aag ttc atc ggg gac gac atg aag atg aag tac 48

Met Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ile Gly Asp Asp Met Lys Met Lys Tyr

1

5

10

15

ttc atg gac gga tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca gtt gaa ggt gaa 96

Phe Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu

20

25

30

ggc aca ggc aaa cct tac gag gga aag cac aaa ata aca ctt gac gtc 144

Gly Thr Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Lys His Lys Ile Thr Leu Asp Val

35

40

45

acc aag ggt ggg cca ctg cct ttt gcg ttt gac ttg ttg tct aca gtg 192

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Leu Leu Ser Thr Val

50

55

60

ttc tct tat ggc aac aga tgc ctt act aaa tat cct gac gat atc ccc 240

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

```

Phe Ser Tyr Gly Asn Arg Cys Leu Thr Lys Tyr Pro Asp Asp Ile Pro
 65              70              75              80
gac tat ttc aaa caa tgc ttt cct gga ggc tat tca tgg gaa aga aag 288
Asp Tyr Phe Lys Gln Cys Phe Pro Gly Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Lys
      85              90              95
ttt gag ttc gaa gat ggc ggg ttg gct ata gcc aaa gcg gaa ata agc 336
Phe Glu Phe Glu Asp Gly Gly Leu Ala Ile Ala Lys Ala Glu Ile Ser
      100             105             110
ctt aaa gga aac tgc ttc gaa cac aaa tcc acc att gaa ggc act ttt 384
Leu Lys Gly Asn Cys Phe Glu His Lys Ser Thr Ile Glu Gly Thr Phe
      115             120             125
ccc gat agc agt cct att gcg caa aac aag acg cta gga tgg gaa cca 432
Pro Asp Ser Ser Pro Ile Ala Gln Asn Lys Thr Leu Gly Trp Glu Pro
      130             135             140
tcc acc gag aag atg acc gtc cgc gac gga tca atg aag ggt gat gat 480
Ser Thr Glu Lys Met Thr Val Arg Asp Gly Ser Met Lys Gly Asp Asp
      145             150             155             160
gcg gcc tac ctc aaa ttg gtg gga ggc ggc aat cac aaa tgc tac ttt 528
Ala Ala Tyr Leu Lys Leu Val Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Tyr Phe
      165             170             175
aca act acc tac aca gcg aag aaa aag att cct aac ctg cca caa agc 576
Thr Thr Thr Tyr Thr Ala Lys Lys Lys Ile Pro Asn Leu Pro Gln Ser
      180             185             190
cat ttc att ggg cat cgc atc tcc agt gtc gtc aat ggc act aaa att 624
His Phe Ile Gly His Arg Ile Ser Ser Val Val Asn Gly Thr Lys Ile
      195             200             205
gga gtg atg gaa gat gca att gct cat ctt tac cct ttt aat ggc gtg 672

```

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Gly Val Met Glu Asp Ala Ile Ala His Leu Tyr Pro Phe Asn Gly Val

210

215

220

cca tgc cag tga

684

Pro Cys Gln

225

<210> 7

<211> 654

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(651)

<400> 7

atg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg aag tac ttc atg gac gga 48

Met Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Lys Tyr Phe Met Asp Gly

1

5

10

15

tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca gtt gaa ggt gaa ggc aca ggc aaa 96

Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu Gly Thr Gly Lys

20

25

30

cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc aag 144

Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala Lys

35

40

45

ggc ggg cca atg cct ttc tcg ttt gac tta gtg tca cac acg ttc tgt 192

Gly Gly Pro Met Pro Phe Ser Phe Asp Leu Val Ser His Thr Phe Cys

50

55

60

tac ggc cac aga cct ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac tat 240

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr
 65 70 75 80
 ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg cag 288
 Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu Gln
 85 90 95
 ttc gaa gat ggt ggg ttt gct gca gtc agt gcg cat ata agc ctt aga 336
 Phe Glu Asp Gly Gly Phe Ala Ala Val Ser Ala His Ile Ser Leu Arg
 100 105 110
 gga aac tgc ttc gag cac aaa tcc aaa ttt gtt ggg gtt aac ttt cct 384
 Gly Asn Cys Phe Glu His Lys Ser Lys Phe Val Gly Val Asn Phe Pro
 115 120 125
 gcc gat ggt cct gtg atg caa aac caa agt tct gat tgg gag cca tca 432
 Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn Gln Ser Ser Asp Trp Glu Pro Ser
 130 135 140
 acc gag aaa att act acc tgc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt acg 480
 Thr Glu Lys Ile Thr Thr Cys Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val Thr
 145 150 155 160
 atg ttc cta aag ctt gcg gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc aag 528
 Met Phe Leu Lys Leu Ala Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe Lys
 165 170 175
 act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg cca caa agc cat 576
 Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gln Ser His
 180 185 190
 ttc atc ggg cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act gag 624
 Phe Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu
 195 200 205
 ctg gta gaa gat gca gta gct cat tgc tga 654

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Cys

210

215

<210> 8

<211> 666

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(663)

<400> 8

atg gcc ctg agc aac aag ttc atc ggg gac gac atg aag atg aag tac 48

Met Ala Leu Ser Asn Lys Phe Ile Gly Asp Asp Met Lys Met Lys Tyr

1 ..

5

10

15

ttc atg gac gga tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca gtt gaa ggt gaa 96

Phe Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Val Glu Gly Glu

20

25

30

ggc aca ggc aaa cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc 144

Gly Thr Gly Lys Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val

35

40

45

aca atg gcc aag ggc ggg cca atg cct ttc tcg ttt gac tta gtg tca 192

Thr Met Ala Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ser Phe Asp Leu Val Ser

50

55

60

cac acg ttc tgt tac ggc cac aga cct ttt act aaa tat cca gaa gag 240

His Thr Phe Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu

65

70

75

80

ata cca gac tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa 288

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu
 85 90 95
 agg tcg ttg cag ttc gaa gat ggt ggg ttt gct gca gtc agt gcg cat 336
 Arg Ser Leu Gln Phe Glu Asp Gly Gly Phe Ala Ala Val Ser Ala His
 100 105 110
 ata agc ctt aga gga aac tgc ttc gag cac aaa tcc aaa ttt gtt ggg 384
 Ile Ser Leu Arg Gly Asn Cys Phe Glu His Lys Ser Lys Phe Val Gly
 115 120 125
 gtt aac ttt cct gcc gat ggt cct gtg atg caa aac caa agt tct gat 432
 Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Asn Gln Ser Ser Asp
 130 135 140
 tgg gag cca tca acc gag aaa att act acc tgc gac gga gtt ctg aag 480
 Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Thr Cys Asp Gly Val Leu Lys
 145 150 155 160
 ggt gat gtt acg atg ttc cta aag ctt gcg gga ggc ggc aat cac aaa 528
 Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Lys Leu Ala Gly Gly Gly Asn His Lys
 165 170 175
 tgc caa ttc aag act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg 576
 Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met
 180 185 190
 cca caa agc cat ttc atc ggg cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc 624
 Pro Gln Ser His Phe Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly
 195 200 205
 aac att act gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tgc tga 666
 Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Cys
 210 215 220

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

gaaggrtgyg tcaayggrca y 21

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

acvggdccat ydgvagaaa rtt 23

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggi gggiig 36

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggcttatatg cgactgact gc

22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

tatctcttca ggatatttag t

21

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggi gggiig 36

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

gggaaaagtg ccttcaatgg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ggccacgcgt cgactagtac 20

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tcttcgaact caaacctttct 20

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gcagtcagtg cgcatataag cc 22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

ccattgaagg cacttttccc 20

WO 03/054191

PCT/JP02/13363

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

cgggatccat gaagatgaag tactttatgg atgg 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/435, C07K19/00, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/435, C07K19/00, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATZ, MV. et al., Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat. Biotechnol. (1999), Vol.17, No.10, pages 969 to 973	1-17
Y	LUKYANOV, KA. et al., Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J.Biol.Chem. (2000), Vol.275, No.34, pages 25879 to 25882	1-17
Y	Takahiro HOSAKA, "Sango kara Hakken sareta Arata na Keikosei Tanpakushitsu", Kagaku to Kogyo, (2000), Vol.53, No.5, page 612	1-17
Y	WO 01/27150 A2 (CLONTECH LAB INC.), 19 April, 2001 (19.04.01), Full text & AU 200110867 A	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 March, 2003 (03.03.03)Date of mailing of the international search report
25 March, 2003 (25.03.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/34320 A2 (CLONTECH LAB INC.), 15 June, 2000 (15.06.00), Full text (Family: none)	1-17
Y	WO 00/34526 A1 (CLONTECH LAB INC.), 15 June, 2000 (15.06.00), Full text & EP 1135532 A1 & JP 2002-531146 A1	1-17
Y	FRADKOV, AF. et al., Novel fluorescent protein from <i>Discosoma</i> coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. FEBS Lett. (2000), Vol.479, No.3, pages 127 to 130	1-17
Y	HEIKAL, AA. et al., Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). Proc.Natl.Acad.Sci.USA. (2000), Vol.97, No.22, pages 11996 to 12001	1-17
Y	Oz Reef Press. Resident of the Month. [online]. Oz Reef Marine Park. (June. 1998), [retrieved on 2003-03-03]. Retrieved from the Internet. <URL: http://ozreef.org/press/1998/june.html#RESIDENT >, <URL: http://web.archive.org/web/20000524121632/http://ozreef.org/press/1998/june.html >	1-17
Y	Oz Reef Press. Resident of the Month. [online]. Oz Reef Marine Park. (May. 1997), [retrieved on 2003-03-03]. Retrieved from the Internet. <URL: http://ozreef.org/press/1997/may.html#RESIDENT >, <URL: http://web.archive.org/web/20000602051932/http://ozreef.org/press/1997/may.html >	1-17

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/13363

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 19/00, G01N 33/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12N 15/09, C07K 14/435, C07K 19/00, G01N 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MATZ, MV. et al., Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat. Biotechnol. (1999) Vol. 17, No. 10, p. 969-973	1-17
Y	LUKYANOV, KA. et al., Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J. Biol. Chem. (2000) Vol. 275, No. 34, p. 25879-25882	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
03.03.03

国際調査報告の発送日
25.03.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
北村 弘樹
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/13363

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	芳坂貴弘、サンゴから発見された新たな蛍光性タンパク質 化学と工業 (2000) 第53巻第5号第612頁	1-17
Y	WO 01/27150 A2 (CLONTECH LAB INC) 2001. 04. 19, 全文 & AU 200110867 A	1-17
Y	WO 00/34320 A2 (CLONTECH LAB INC) 2000. 06. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-17
Y	WO 00/34526 A1 (CLONTECH LAB INC) 2000. 06. 15, 全文 & EP 1135532 A1 & JP 2002-531146 A1	1-17
Y	FRADKOV, AF. et al., Novel fluorescent protein from Discosoma coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. FEBS Lett. (2000) Vol. 479, No. 3, p. 127-130	1-17
Y	HEIKAL, AA. et al., Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2000) Vol. 97, No. 22, p. 11996-12001	1-17
Y	Oz Reef Press. Resident of the Month. [online]. Oz Reef Marine Park. (Jun. 1998) [retrieved on 2003-03-03]. Retrieved from the Internet. <URL:http://ozreef.org/press/1998/june.html#RESIDENT>, <URL:http://web.archive.org/web/20000524121632/http://ozreef.org/press/1998/june.html>	1-17
Y	Oz Reef Press. Resident of the Month. [online]. Oz Reef Marine Park. (May. 1997) [retrieved on 2003-03-03]. Retrieved from the Internet. <URL:http://ozreef.org/press/1997/may.html#RESIDENT>, <URL:http://web.archive.org/web/20000602051932/http://ozreef.org/press/1997/may.html>	1-17

SAKAI & Associates

3873-1, HIGASHITERAO, MATSUSHIRO-MACHI
NAGANO-SHI, NAGANO 381-1225, JAPAN
TELEPHONE: +81-26-278-1375 FACSIMILE: +81-26-278-1376

January 09, 2007
By facsimile only

Mr. Bruce H. Bernstein
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191-1411
U.S.A.

RECEIVED

JAN 09 2007

GREENBLUM & BERNSTEIN PLC

Re: U.S. National Stage Patent Application
No. 10/493,301;
in the names of H. OYAKE et al.;
for TDK Corporation;
Your Ref.: P25251;
Our Ref.: F0222PUS(99P03471; US 4417)

Dear Mr. Bruce H. Bernstein;

Please be advised that we have received TDK Corporation's instructions to abandon the above-identified application. Accordingly, please take no further actions in the application and close your file. We await your final debit note for services rendered through the time of this notice of abandonment.

We deeply appreciate courtesies and assistance you have extended to us during prosecution of the above-identified application.

If you have any questions, please do not hesitate to contact us. Please acknowledge safe receipt of this letter by return facsimile.

Very truly yours,

Greenblum & Bernstein, P.L.C.

RECEIVED

JAN 09 2007

☐ Cover Letter
☒ Fax/E-mail
☐ Original

SS/my

Shinji Sakai

Shinji SAKAI
Patent Attorney
SAKAI & Associates

TIANNE PEARSON

From: Huang Bao-Shan [bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Monday, January 08, 2007 3:34 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON; Rose Stuart; Goodman Tim
Subject: RE: Methylphenidate
Importance: High

Paul,

The m.p. of Methylphenidate solid we made for one batch is 43.1 to 43.7 degree C and for the other batch is 43.1 to 43.4 degree C. Both were lab scale samples. We will do more experiments with different conditions. When we have results I will let you know. It may be two weeks later.

Bao-Shan

-----Original Message-----

From: Huang Bao-Shan
Sent: Thursday, January 04, 2007 5:51 PM
To: 'PAUL BRAIER'
Cc: 'ARNOLD TURK'; 'TIANNE PEARSON'; Rose Stuart
Subject: Methylphenidate

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

The following is a procedure for preparation of d,l-Methylphenidate in solid forms.

A mixture of 70.89 g (0.263 mmol, 1.00 equiv.) d,l-methylphenidate hydrochloride, 35.65 g water, 22.07 g (0.276 mmole, 1.05 equiv.) 50% sodium hydroxide solution and 600 mL (ca. 463 g) methylcyclohexane is stirred until all solids dissolve. Layers are allowed to settle, and the lower (aqueous) phase is separated as completely as possible. Remaining organic layer is distilled under vacuum until 400 to 500 mL distillate is collected.

The warm distilled solution remaining in the pot is filtered into a crystallizer (rinsed through with a portion of methylcyclohexane). Batch is stirred, cooled, and seeded with solid d,l-methylphenidate base. Product slurry is stirred for several hours at low temperature, then filtered. Product cake is washed with chilled methylcyclohexane, and left to dry in a vacuum oven at room temperature (with a slow bleed of nitrogen).

We need to compare this with existing patents including U.S. Patent 6,096,760 (Aug. 1, 2000). This is our first priority project, because our customer is waiting for the product for testing.

Best regards,

Bao-Shan

1/9/2007

TIANNE PEARSON

From: PAUL BRAIER
Sent: Monday, January 08, 2007 5:19 PM
To: TIANNE PEARSON
Subject: FW: Patent Related Projects
G&B File Number: 4093

Tianne, here is the email I mentioned (it was -300, not -299). --Paul

From: NGA NGUYEN
Sent: Friday, January 05, 2007 3:27 PM
To: PAUL BRAIER
Subject: RE: Patent Related Projects

Hi Paul,

Also, on 12/7/2006 we received instruction to close file P31300. Please check.

Nga

From: PAUL BRAIER
Sent: Friday, January 05, 2007 1:18 PM
To: Docketing Group
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON; BING ZUO
Subject: FW: Patent Related Projects

The client mixed a lot of different projects together. Can you please match this with job files J409301, -02, -04, and -05 and with prosecution files P31168, P31299 and P31300?

From: Huang Bao-Shan [mailto:bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Friday, January 05, 2007 1:05 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: TIANNE PEARSON; Huang Bao-Shan
Subject: Patent Related Projects

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

At this moment, we have the following patent related issues:

1. **Process for Preparing d,l-Methylphenidate Base in Crystalline Form** – We like to make it outside claims of prior art of US Patent 6,096,760 (Aug. 1, 2000). Orrin provided the procedure to me on 1/4/07. I am working with Paul Braier for the patent infringement issue. Our customer is asking for samples.

1/9/2007

2. **Process for Preparing Oxycodone HCl with not more than 10 ppm 14-Hydroxycodone** – We like to produce it outside claims of prior arts of US Patent 7,153,966 (Dec.26, 2006), 7,129,248 B2 (Oct. 31, 2006) and 7,071,336 (July 4, 2006). Paul Braier is asking for a complete literature search, he has drafted a strategy for this.
3. **Process for Preparing Hydromorphone** – We like to make it outside the claims of the J&J patent application US 2006/0235039 A1 (Oct. 19, 2006) and US 2006/0009479 A1 (Jan.12, 2006). The latter is still under final rejection, and the US PTO records do not indicate that a response to the final rejection has been filed since July 2006. J&J still has 3 weeks to response it. It remains possible that some of the claims could be accepted, with this rejection being just for one or more claims. It may take a while until we can find out the details. Paul Braier monitors it weekly. However, our procedure is outside their claims. The former patent application disclosed four polymorphs. We need to look into it.
4. **Process for Preparing Oxymorphone** – Our regular US patent application was filed 12/14/06. We have to make a decision to file or not for our international patent application. We have to file them before 10/17/07, which we filed our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811). We should file patent applications for at least in the following countries: EU, UK, Germany, Spain, Israel, Australia, China, India and Hungary.
5. **Process for preparing Naltrexone from Oripavine** – The procedure was filed to US Patent Office in our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811) on 10/17/06. Paul Braier will draft the patent application.
6. **Process for preparing Buprenorphine from Oripavine** -- The procedure was filed to US Patent Office in our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811) on 10/17/06. Paul Braier will draft the patent application.

These are what I have in my plan for discussion in Monday's meeting. Correct me, if you see anything wrong.

Have a nice weekend!

Bao-Shan

The information contained in this e-mail message is intended only for the personal and confidential use of the recipient(s) named above. This message may be an attorney-client communication and as such is privileged and confidential. If the reader of this message is not the intended recipient or an agent responsible for delivering it to the intended recipient, you are hereby notified that you have received this document in error and that any review, dissemination, distribution, or copying of this message is strictly prohibited. If you have received this communication in error, please notify us immediately by e-mail, and delete the original message. **In rare cases, our spam scanners may eliminate legitimate email from clients unnoticed. Please immediately advise us if you receive an error notification from our server.**

TIANNE PEARSON

From: PAUL BRAIER
Sent: Monday, January 08, 2007 4:58 PM
To: 'Huang Bao-Shan'
Cc: YOVANA BURNS; TIANNE PEARSON
Subject: G&B reference codes (G&B ref. J409301)
Importance: High
G&B File Number: J409301

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Dear Bao-Shan,

We now have several different projects open for Penick. In order to work more efficiently (and at less cost to Penick), it is important for certain information to be included in facsimiles and other correspondence we receive from you. Similarly, it is important that the proper people be included in the CC lines of emails.

Most importantly, each file we open is assigned a unique reference code. In order to make sure that correspondence is promptly matched with the proper file, the reference code (which generally begins with a J or a P) should be included all correspondence, and in the subject lines of all emails (as in this email).

If Penick Corp has reference codes for these projects, then e could also use those to help identify the projects. If this is the case, please let me know, and we will include your reference codes in our emails as well.

For your convenience, I am providing a list of the various open files we have for Penick Corp., along with their G&B reference codes, and identifying which people should be CC'ed in emails.

Prosecution Files:

Please CC Arnold Turk (senior prosecution partner aturk@gbpatent.com) and Tianne Pearson (administrative assistant tpearson@gbpatent.com)

V30811 Process for Manufacturing Opioids (provisional application already filed)
P31168 Process for Manufacturing Opioids (regular application already filed)
P31299 Buprenorphine from Oripavine
P31300 Naltrexone from Oripavine

Job Files:

1/9/2007

Please CC Yovana Burns (paralegal yovanab@gbpatent.com)

J409301 General Penick job file
J409302 J&J hydromorphone application
J409303 Oxymorphone patentability search (currently inactive)
J409304 Highly pure oxycodone
J409305 Solid d,l-methylphenidate

On J409304 and J409305, please also CC technical expert Katrin Venter, Ph.D.
(kventer@gbpatent.com).

If you have any questions about these reference codes or on whom to include in emails, please do not hesitate to contact me. As I mentioned, this streamlines matching documents with the proper files, and ultimately reduces Penick's costs as well.

Best regards,
Paul

Paul A. Braier, Ph.D., Esq.
Greenblum & Bernstein, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, Virginia 20191
+703-716-1191 direct
+703-716-1180 facsimile
email: pbraier@gbpatent.com
<http://www.gbpatent.com>

The information contained in this e-mail message is intended only for the personal and confidential use of the recipient(s) named above. This message may be an attorney-client communication and as such is privileged and confidential. If the reader of this message is not the intended recipient or an agent responsible for delivering it to the intended recipient, you are hereby notified that you have received this document in error and that any review, dissemination, distribution, or copying of this message is strictly prohibited. If you have received this communication in error, please notify us immediately by e-mail, and delete the original message. **In rare cases, our spam scanners may eliminate legitimate email from clients unnoticed. Please immediately advise us if you receive an error notification from our server.**

TIANNE PEARSON

From: Huang Bao-Shan [bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Thursday, January 04, 2007 4:26 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON
Subject: J&J's Hydromorphone Patent Application Monitoring

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

Do you have any new information on the following J&J's Hydromorphone patent application?

Application No. 20050222188, Oct. 6, 2005 (Reference US patent 3,812,132)

Best regards,

Bao-Shan

TIANNE PEARSON

From: PAUL BRAIER
Sent: Thursday, January 04, 2007 6:00 PM
To: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON
Subject: FW: Methylphenidate
G&B File Number: J409305

Arnie and Tianne -- disregard this email. It relates to a J-file. --Paul

From: Huang Bao-Shan [mailto:bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Thursday, January 04, 2007 5:51 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON; Rose Stuart
Subject: Methylphenidate

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

The following is a procedure for preparation of d,l-Methylphenidate in solid forms.

A mixture of 70.89 g (0.263 gmol, 1.00 equiv.) d,l-methylphenidate hydrochloride, 35.65 g water, 22.07 g (0.276 gmole, 1.05 equiv.) 50% sodium hydroxide solution and 600 mL (ca. 463 g) methylcyclohexane is stirred until all solids dissolve. Layers are allowed to settle, and the lower (aqueous) phase is separated as completely as possible. Remaining organic layer is distilled under vacuum until 400 to 500 mL distillate is collected.

The warm distilled solution remaining in the pot is filtered into a crystallizer (rinsed through with a portion of methylcyclohexane). Batch is stirred, cooled, and seeded with solid d,l-methylphenidate base. Product slurry is stirred for several hours at low temperature, then filtered. Product cake is washed with chilled methylcyclohexane, and left to dry in a vacuum oven at room temperature (with a slow bleed of nitrogen).

We need to compare this with existing patents including U.S. Patent 6,096,760 (Aug. 1, 2000). This is our first priority project, because our customer is waiting for the product for testing.

Best regards,

Bao-Shan

TIANNE PEARSON

From: PAUL BRAIER
Sent: Thursday, January 04, 2007 4:45 PM
To: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON
Subject: FW: J&J's Hydromorphone Patent Application Monitoring
G&B File Number: --

You can disregard this email. It is related to a non-prosecution file. --Paul

From: Huang Bao-Shan [mailto:bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Thursday, January 04, 2007 4:26 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON
Subject: J&J's Hydromorphone Patent Application Monitoring

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

Do you have any new information on the following J&J's Hydromorphone patent application?

Application No. 20050222188, Oct. 6, 2005 (Reference US patent 3,812,132)

Best regards,

Bao-Shan

TIANNE PEARSON

From: PAUL BRAIER
Sent: Friday, January 05, 2007 1:18 PM
To: Docketing Group
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON; BING ZUO
Subject: FW: Patent Related Projects
G&B File Number: 4093

The client mixed a lot of different projects together. Can you please match this with job files J409301, -02, -04, and -05 and with prosecution files P31168, P31299 and P31300?

From: Huang Bao-Shan [mailto:bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Friday, January 05, 2007 1:05 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: TIANNE PEARSON; Huang Bao-Shan
Subject: Patent Related Projects

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

At this moment, we have the following patent related issues:

1. **Process for Preparing d,l-Methylphenidate Base in Crystalline Form** – We like to make it outside claims of prior art of US Patent 6,096,760 (Aug. 1, 2000). Orrin provided the procedure to me on 1/4/07. I am working with Paul Braier for the patent infringement issue. Our customer is asking for samples.
2. **Process for Preparing Oxycodone HCl with not more than 10 ppm 14-Hydroxycodone** – We like to produce it outside claims of prior arts of US Patent 7,153,966 (Dec.26, 2006), 7,129,248 B2 (Oct. 31, 2006) and 7,071,336 (July 4, 2006). Paul Braier is asking for a complete literature search, he has drafted a strategy for this.
3. **Process for Preparing Hydromorphone** – We like to make it outside the claims of the J&J patent application US 2006/0235039 A1 (Oct. 19, 2006) and US 2006/0009479 A1 (Jan.12, 2006). The latter is still under final rejection, and the US PTO records do not indicate that a response to the final rejection has been filed since July 2006. J&J still has 3 weeks to response it. It remains possible that some of the claims could be accepted, with this rejection being just for one or more claims. It may take a while until we can find out the details. Paul Braier monitors it weekly. However, our procedure is outside their claims. The former patent application disclosed four polymorphs. We need to look into it.
4. **Process for Preparing Oxymorphone** – Our regular US patent application was filed 12/14/06.

1/9/2007

We have to make a decision to file or not for our international patent application. We have to file them before 10/17/07, which we filed our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811). We should file patent applications for at least in the following countries: EU, UK, Germany, Spain, Israel, Australia, China, India and Hungary.

5. **Process for preparing Naltrexone from Oripavine** – The procedure was filed to US Patent Office in our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811) on 10/17/06. Paul Braier will draft the patent application.
6. **Process for preparing Buprenorphine from Oripavine** -- The procedure was filed to US Patent Office in our provisional patent application (No. 60/829,817, our reference No V30811) on 10/17/06. Paul Braier will draft the patent application.

These are what I have in my plan for discussion in Monday's meeting. Correct me, if you see anything wrong.

Have a nice weekend!

Bao-Shan

The information contained in this e-mail message is intended only for the personal and confidential use of the recipient(s) named above. This message may be an attorney-client communication and as such is privileged and confidential. If the reader of this message is not the intended recipient or an agent responsible for delivering it to the intended recipient, you are hereby notified that you have received this document in error and that any review, dissemination, distribution, or copying of this message is strictly prohibited. If you have received this communication in error, please notify us immediately by e-mail, and delete the original message. **In rare cases, our spam scanners may eliminate legitimate email from clients unnoticed. Please immediately advise us if you receive an error notification from our server.**

TIANNE PEARSON

From: Huang Bao-Shan [bao-shanhuang@penickcorp.com]
Sent: Thursday, January 04, 2007 5:51 PM
To: PAUL BRAIER
Cc: ARNOLD TURK; TIANNE PEARSON; Rose Stuart
Subject: Methylphenidate

CONFIDENTIAL COMMUNICATION:
Subject to Attorney-Client Privilege and Other Protections

Paul,

The following is a procedure for preparation of d,l-Methylphenidate in solid forms.

A mixture of 70.89 g (0.263 gmol, 1.00 equiv.) d,l-methylphenidate hydrochloride, 35.65 g water, 22.07 g (0.276 gmole, 1.05 equiv.) 50% sodium hydroxide solution and 600 mL (ca. 463 g) methylcyclohexane is stirred until all solids dissolve. Layers are allowed to settle, and the lower (aqueous) phase is separated as completely as possible. Remaining organic layer is distilled under vacuum until 400 to 500 mL distillate is collected.

The warm distilled solution remaining in the pot is filtered into a crystallizer (rinsed through with a portion of methylcyclohexane). Batch is stirred, cooled, and seeded with solid d,l-methylphenidate base. Product slurry is stirred for several hours at low temperature, then filtered. Product cake is washed with chilled methylcyclohexane, and left to dry in a vacuum oven at room temperature (with a slow bleed of nitrogen).

We need to compare this with existing patents including U.S. Patent 6,096,760 (Aug. 1, 2000). This is our first priority project, because our customer is waiting for the product for testing.

Best regards,

Bao-Shan

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.